

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. Februar 2001 (22.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/13115 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/543, C12Q 1/68 (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstr. 49A, 91052 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02758

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. August 2000 (12.08.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 38 138.0 16. August 1999 (16.08.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, D-91056 Erlangen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERTLING, Wolf [DE/DE]; Meisenweg 22, D-91056 Erlangen (DE). HAS-SMANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118a, D-91052 Erlangen (DE). KOSAK, Hans [DE/DE]; Von-Witzleben-Strasse 23, D-53123 Bonn (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR IDENTIFYING A BIOPOLYMER SEQUENCE ON A SOLID SURFACE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR IDENTIFIKATION EINER BIOPOLYMERSEQUENZ AUF FESTKÖRPEROBERFLÄCHEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying a biopolymer spread on a first surface of a solid substrate, whereby the first biopolymer is brought into contact with a second biopolymer which spread on a second surface, whereby said second biopolymer has an affinity for the first biopolymer; Biopolymer in Kontakt gebracht wird und wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung der durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz, der Leitfähigkeit im Gleichstrom- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation eines auf einer ersten Oberfläche eines Festkörpersubstrats aufgetragenen ersten Biopolymers, wobei das erste Biopolymer mit einem dazu affinen, zweiten sich auf einer zweiten Oberfläche befindenden Biopolymer in Kontakt gebracht wird und wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung der durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit im Gleichstrom- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz.

WO 01/13115 A2

Verfahren und Vorrichtung zur Identifikation einer Biopolymersequenz auf Festkörperoberflächen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur
5 Identifikation einer spezifischen Biopolymersequenz, die auf
einer Festkörperoberfläche gebunden ist.

Aus der US 5,780,234 ist es bekannt, den Zustand der Hybridi-
sierung durch Änderung der elektrischen Leitfähigkeit nachzu-
10 weisen. Dazu ist es nach der Lehre der US 5,780,234 erforder-
lich, daß ein Transfer von freien Elektronen stattfindet. Zu
diesem Zweck sind die Nukleinsäuresequenzen mit Elektronendo-
natoren bzw. -akzeptoren kombiniert. Bei einer Hybridisierung
kann es zum Ladungstransport kommen. Die Anlagerung des nach-
15 zuweisenden Oligonukleotids erfolgt hier aus der Lösung.

Weitere Verfahren zur Identifikation einer Polymersequenz
sind bekannt aus der WO 99/29898, US 5,065,798, WO 98/48275,
US 5,866,336 sowie WO 99/11813.

20

Aus H.W. Fink, C. Schönenberger, Nature **398**, 407 (1999) ist
bekannt, daß die Leitfähigkeit einzelner DNA-Doppelstränge in
der Größenordnung guter Halbleiter oder leitfähiger Polymere
liegt.

25

S.O. Kelley, N.M. Jackson, M.G. Hill, J.K. Barton, Angew.
Chem. Int. Ed. Engl. **38**, 941 (1999) offenbaren, daß Monolagen
von DNA-Doppelsträngen auf Elektrodenoberflächen eine hohe
Leitfähigkeit und einen schnelleren Ladungstransfer auch über
30 große Abstände aufweisen.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine neue Technologie bereitzustellen, mit der an eine feste Oberfläche fixierte Biopolymere eindeutig, schnell und sensitiv identifiziert werden können.

5

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 7 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 6 und 8 bis 12.

10 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifikation eines auf einer ersten Oberfläche eines ersten Substrats aufgebrachtten ersten Biopolymers vorgesehen, wobei das erste Biopolymer mit einem dazu affinen, zweiten sich auf einer Oberfläche eines zweiten Substrats befindenden Biopolymer in

15 Kontakt gebracht wird und wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung der durch affinitätsbedingte Adhäsion bewirkten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit.

20 Unter einem Biopolymer wird insbesondere ein aus Nukleotiden oder Aminosäuren gebildetes Polymer verstanden, z.B. DNA, RNA, PNA, PTO, Peptid, Protein u. dgl.. Unter einem affinen Biopolymer wird ein Biopolymer verstanden, das mit einem korrespondierenden Biopolymer eine Bindung eingehen kann. Die

25 Bindung kann eine kovalente, ionische oder auf Wasserstoffbrücken beruhende Bindung sein. Auch eine durch sterische Effekte hervorgerufene Bindung kommt in Betracht.

Durch die elektronische Detektion der z.B. bei der Hybridisierung auftretenden Leitfähigkeitsänderung zwischen zwei
30 Oberflächen wird die Sensitivität und Spezifität erhöht sowie apparativer Aufwand herabgesetzt.

Mögliche Einsatzfelder des erfindungsgemäßen Verfahrens liegen in der medizinischen Diagnostik-, Identifikations-, Codierungs- und Erkennungstechnik.

- 5 Als Änderung kann die Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit im Gleichstrom- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Stromfrequenz gemessen werden. Dabei kann eine der Oberflächen elektrisch leitfähig sein und die Änderung über diese
10 Oberfläche gemessen werden. Die Oberflächen können aber auch durch einen Isolator getrennt werden. Dabei kann das erste und/oder zweite Biopolymer als Schicht auf die Oberfläche aufgebracht sein, wobei darin elektroaktive Metallatome, -ionen, -cluster oder Komplexmoleküle eingebracht werden. Nach
15 einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, daß die Bestimmung der Änderung mittels einer Referenzelektrode und/oder einer Gegenelektrode durchgeführt wird.

- Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Vorrichtung zur
20 Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, wobei auf einer Oberfläche eines ersten Substrats ein erstes Biopolymer derart aufgebracht ist, daß es mit einem dazu affinen, zweiten auf einer Oberfläche eines zweiten Substrats aufgebrachten Biopolymer in Kontakt bringbar ist, und wobei
25 zur Identifikation des ersten Biopolymers eine Einrichtung zur Auswertung einer durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit vorgesehen ist.

- 30 Ausgestaltungen der Erfindung werden im folgenden erläutert. Die erfindungsgemäße Identifikation der Biopolymere auf einer

Festkörperoberfläche erfolgt vorteilhafterweise nach folgender Vorgehensweise:

Die auf der Oberfläche des ersten Substrats fixierten ersten
5 Biopolymere werden mit dazu affinen zweiten Biopolymeren in Kontakt gebracht. Das hat eine Hybridisierung zur Folge. Die zweiten Biopolymere können auf einer Oberfläche eines zweiten Substrats fixiert sein und z.B. durch Aufeinanderpressen mit den zu identifizierenden ersten Biopolymeren in Kontakt ge-
10 bracht werden. Als Substratwerkstoff kommt Glas, Kunststoff oder Metall in Betracht. Letztere können in Form einer Folie ausgebildet sein.

Wenn die Hybridisierung zwischen zwei parallelen Oberflächen
15 erfolgt, kann die Änderung in der Leitfähigkeit zwischen den beiden Oberflächen zur Detektion verwendet werden. Dies gilt in beiden Ausgestaltungsformen sowohl für Gleich- als auch Wechselstromleitfähigkeitsphänomene. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit können in den aus den Biopolymeren gebildeten Dün-
20 filmen auch Metallatome, -ionen, -cluster oder Komplexmoleküle eingelagert werden. Alternativ kann die Detektion auch über Fluoreszenz oder andere optische Methoden erfolgen. Leitfähige Cluster können dabei zur Verstärkung optischer Signale eingesetzt werden.

25 In einer Ausgestaltungsform werden als zu identifizierende erste Biopolymere Nukleinsäuren einer bestimmten Sequenz kovalent an eine leitfähige Oberfläche des ersten Substrats gebunden. Dazu komplementäre Nukleinsäuren sind an ein zweites
30 leitfähiges Substrat gebunden, das mit dem ersten durch Aufeinanderpressen in Kontakt gebracht wird. Bei einer Hybridisierung der Nukleinsäuren verringert sich der elektrische Wi-

derstand. Das kann durch konventionelle elektronische Methoden nachgewiesen werden.

Es ist auch möglich, die mit der Hybridisierung einhergehenden Änderungen der Kapazitäten in der hybridisierenden Schicht Wechselstromwiderstände zu detektieren. Weiterhin ist auch der Einsatz elektrochemischer Signale, wie z.B. spezifischer Reduktions- und Oxidationspeaks, zur Identifikation der Hybridisierung einsetzbar.

10

Die elektronischen Meßgrößen können verstärkt werden, indem in die Schicht der zu detektierenden Biopolymere Metallatome, -cluster oder -ionen eingebracht werden. Das kann sowohl vor als auch nach der Hybridisierung, z.B. durch Bedampfen oder elektrochemische Methoden, erfolgen. Weiterhin ist auch der Einsatz von komplexen Molekülen möglich, die sich z.B. bei Nukleinsäuren spezifisch an einzelsträngige Strukturen oder auch als Interkalatoren an doppelsträngige Konformationen anlagern und elektroaktive Zentren aufweisen.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren kann z.B. im Bereich der Sicherheitstechnik zur fälschungssicheren Markierung und Identifizierung von Banknoten, Chipkarten, Ausweisen u.ä. verwendet werden. Im Falle der Identifizierung unter Verwendung einer flüssigen Phase kann das Verfahren auch zur Markierung und Identifizierung z.B. von Lebensmitteln, Medikamenten o.ä. eingesetzt werden.

25

Beispiel:

30 Oligonukleotide einer Länge von 21 Basen werden am 5'-Ende kovalent an die Oberfläche eines leitfähigen Polykarbonat/Kohlefaser-Kunststoffes fixiert.

Die an der Oberfläche befindlichen Oligonukleotide werden mit an einer zweiten Oberfläche befindlichen komplementären Sonden hybridisiert. Das geschieht durch Inkontaktbringen der beiden Oberflächen. Wird zwischen der leitfähigen Kunststoff-
5 oberfläche und der zweiten Oberfläche eine Wechselspannung einer Frequenz von 250 Hz angelegt und der kapazitive Anteil des Wechselstromes gemessen, so ergibt sich bei Hybridisierung ein Abfall der Wechselstromleitfähigkeit um mehr als 10%. Damit kann die Hybridisierung des Oligonukleotids nach-
10 gewiesen werden. Kontrollversuche mit nicht spezifischen Oligonukleotiden ergeben keine wesentliche Leitfähigkeitsänderung.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifikation eines auf einer Oberfläche eines ersten Substrats aufgetragenen ersten Biopolymers,
5 wobei das erste Biopolymer mit einem dazu affinen, zweiten sich auf einer Oberfläche eines zweiten Substrats befindenden Biopolymer in Kontakt gebracht wird und
- 10 wobei die Identifikation des ersten Biopolymers vorgenommen wird durch Auswertung der durch die affinitätsbedingten Adhäsion bewirkten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit im Gleich- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz gemessen wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei mindestens eine der Oberflächen elektrisch leitfähig ist und die Änderung über diese Oberfläche gemessen wird.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Oberflächen durch einen Isolator getrennt werden.
- 25 5. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüchen, wobei das erste und/oder zweite Biopolymer als Schicht auf die Oberfläche aufgetragen wird, wobei darin elektroaktive Metallatome, -ionen, -cluster oder Komplexmoleküle eingebracht werden.

6. Verfahren nach den vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung der Änderung mittels einer Referenzelektrode und/oder einer Gegenelektrode durchgeführt wird.

5 7. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei auf einer Oberfläche eines ersten Substrats ein erstes Biopolymer derart aufgebracht ist, daß es mit einem dazu affinen, zweiten auf einer Oberfläche eines zweiten Substrats aufgetragenen Biopolymer in
10 Kontakt bringbar ist, und wobei zur Identifikation des ersten Biopolymers eine Einrichtung zur Auswertung einer durch affinitätsbedingte Adhäsion ausgelösten Änderung der Impedanz oder der Leitfähigkeit vorgesehen ist.

15 8. Vorrichtung nach Anspruch 7, wobei mittels der Einrichtung zur Auswertung die Änderung im Gleichstrom- und/oder Wechselstrombereich in Abhängigkeit von einer aufgeprägten Wechselspannungs- oder Wechselstromfrequenz meßbar ist.

20 9. Vorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, wobei mindestens eine der Oberflächen elektrisch leitfähig ist und die Änderung über diese Oberfläche meßbar ist.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei des
25 erste und/oder zweite Biopolymer auf einem auf der Oberfläche vorgesehenen Isolator aufgebracht ist.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei das
30 erste und/oder zweite Biopolymer in Form einer Schicht auf die Oberfläche ist/sind und die Schicht mit elektroaktiven Metallatomen, -ionen, -cluster oder Komplexmolekülen versehen ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei eine Referenzelektrode und/oder eine Gegenelektrode vorgesehen ist/sind.